

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-344663

(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl.

A61K 31/095

A61K 31/00

A61K 31/40

// C07D293/12

(21)Application number : 11-151385

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 31.05.1999

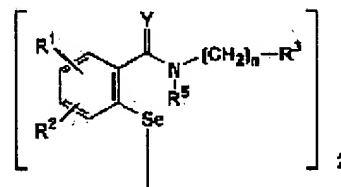
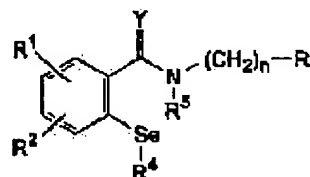
(72)Inventor : NAGATA IZUMI
NAMURA NAOTAKE
MASAYASU HIROYUKI

(54) DEPRESSANT AGAINST CEREBRAL NECROSIS CAUSED BY APOPTOSIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject depressant that suppress the cerebral necrosis caused by apoptosis, can ameliorate the survival rate of cerebral neurocytes at cerebral ischemia and can attain the brain protection by using ebselen and its analogous compounds as an active ingredient.

SOLUTION: This depressant comprises a compound of formula I or formula II (R1 and R2 are each H, a halogen, trifluoromethyl, nitro, a 1-6C alkyl or alkoxy or the like; R3 is an aryl, an aromatic heterocyclic ring group, a 5-7-membered cycloalkyl or the like; R4 is H, hydroxyl group, -S-glutathione or the like; R5 is H, a 1-6C alkyl; Y is O or S; n is 0-6; Se may be oxidized) as an active ingredient. In a preferred embodiment, for example, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazole-3(2H)-one is employed. The daily dose of this compound is, for example, 0.05-5,000 mg in oral administration/adult.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-344663

(P2000-344663A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチコード [*] (参考)
A 6 1 K 31/095		A 6 1 K 31/095	4 C 0 8 6
31/00	6 2 6	31/00	6 2 6 N 4 C 2 0 6
31/40	6 0 2	31/40	6 0 2
// C 0 7 D 293/12		C 0 7 D 293/12	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-151385

(22) 出願日 平成11年5月31日 (1999. 5. 31)

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 永田 泉

兵庫県宝塚市仁川台232

(72) 発明者 名村 尚武

大阪府吹田市青山台三丁目50 D-11
205号

(72) 発明者 政安 裕之

東京都江戸川区清新町1-4-12-304

(74) 代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外2名)

最終頁に続く

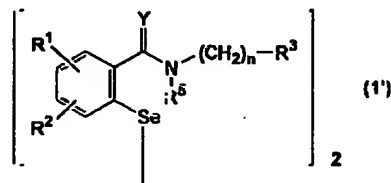
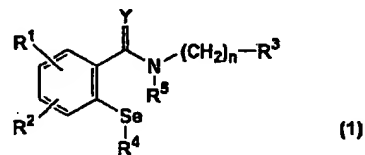
(54) 【発明の名称】 アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬

(57) 【要約】

【課題】 脳虚血時におけるアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制して脳保護を達成できる医薬を提供する。

【解決手段】 以下の一般式 (I) 又は (I') (R¹ 及び R² は水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基などを示し; R³ はアリール基、芳香族複素環基などを示し; R⁴ は水素原子、水酸基、-S- α -アミノ酸基などを示し; R⁵ は水素原子又は炭素数1~6のアルキル基を示し; Y は酸素原子又は硫黄原子を示し; n は0~5の整数を示し; セレン原子は酸化されていてもよい) で表わされる化合物 (2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレンゾール-3 (2H)-オン又はその開環体など) を含むアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制剤。

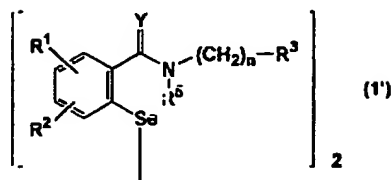
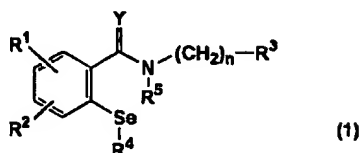
【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の一般式 (I) 又は (I') :

【化1】



(式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数1〜6のアルキル基、又は炭素数1〜6のアルコキシル基を示し、R¹及びR²が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく；R³はアリール基、芳香族複素環基、5〜7員のシクロアルキル基、又は5〜7員のシクロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロアルキル基、及び該シクロアルケニル基は1個又は2個以上の置換基を有していてもよく；R⁴は水素原子、水酸基、-S-グルタチオン基、-S-α-アミノ酸基、又はアリール部分に1個又は2個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し；R⁵は水素原子又は炭素数1〜6のアルキル基を示し、R⁴及びR⁵は一緒になって単結合を形成してもよく；Yは酸素原子又は硫黄原子を示し；nは0〜5の整数を示し；セレン原子は酸化されていてもよい)で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬。

【請求項2】 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む請求項1に記載のアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬。

【請求項3】 脳細胞が脳神経細胞である請求項1又は2に記載の脳細胞死の抑制薬。

【請求項4】 アポトーシスが脳虚血によって発生するアポトーシスである請求項1から3のいずれか1項に記載の脳細胞死の抑制薬。

【請求項5】 請求項1に記載の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む脳保護剤。

【請求項6】 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、請求項5に記載の脳保護剤。

【請求項7】 脳虚血によって発生するアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制する請求項5又は6に記載の脳保護剤。

【請求項8】 脳細胞が脳神経細胞である請求項7に記載の脳保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬及び脳保護剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、虚血性神経細胞死は、虚血巣中心部においてオルガネラの膨化や核の凝集など病理学的に無秩序な典型的な壊死の状態を示すことから、脳虚血に陥った細胞における壊死 (Necrosis) による神経細胞死であるとされてきた。しかしながら、軽度の脳虚血時には壊死とは全く異なった病理像を呈することから (Brain Res. Mol., 29, pp.1-14, 1995; J. Neurol. Sci., 150, pp.93-102)、これらの神経細胞では、壊死に加えてアポトーシスが誘発されていると考えらるようになった (Science, 281, pp.1302-1304, 1998)。

【0003】アポトーシス (プログラム細胞死とも呼ばれる) では、細胞死へのスイッチがオンになってから一連のシグナルカスケードが進行し、細胞死の実行分子であるカスパーゼが活性化され、最終的に細胞が死に至ると考えられている (Science, 281, pp.1312-1316, 1998)。新生児期の低酸素脳症にもカスパーゼの活性化を介するアポトーシスの関与が示唆されている (J. Clin. Invest., 101, pp.1992-1999, 1998)。また、損傷脳領域と神経線維連絡を持つ遠隔部位領域の神経細胞が二次的に細胞死に至ることが知られており、これにもアポトーシスが深く関与していることが判明している (Brain Res., 795, pp.1-9, 1998)。

【0004】脳虚血におけるアポトーシスは、虚血壊死 (コア部分) の辺縁部 (ペナンプラ領域) において壊死より少し遅れて出現することが認められている。従って、脳虚血時のアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制するための治療開始時間 (治療タイムウインドー) は、壊死に比べて許容度が大きく、発症後数時間を経て薬剤を投与してもアポトーシスに起因する細胞死を抑制できる可能性がある。また、このことによって、アポトーシスに陥る運命にある細胞を保護して生存細胞数を増やすことができ、さらに遠隔部位領域における二次的な変性を阻止して神経機能後遺障害を軽減できる可能性がある。

【0005】一方、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセナゾール-3(2H)-オン (以下、本明細書において「エプセ

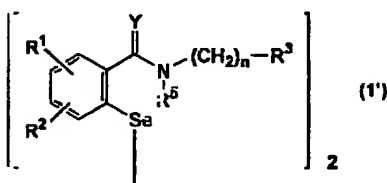
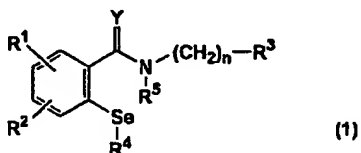
レン (ebselen)」と呼ぶ場合がある。) は、グルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有する抗酸化剤であり、活性酸素種に対する抑制作用やリポキシゲナーゼに対する阻害活性を有すること、及び動物病態モデルにおいて脳梗塞サイズを縮小する効果を有することが確認されている (Br. J. Pharmacol., 122, pp.1251-1256, 1997; Acta. Neurochir. (suppl.), 51, pp.239-241, 1990)。また、エブセレンは、くも膜下出血や脳梗塞患者において患者機能予後を有意に改善し (Neurosurgery, 42, 2, pp.269-278, 1998; Stroke, 29, 1, pp.12-17, 1998)、MCAM₁ 部閉塞急性期脳梗塞患者において脳梗塞サイズの拡大を有意に抑制する (Cerebrovascular Diseases, 9, pp.112-118, 1999)。しかしながら、エブセレンが細胞死、特にアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制することは従来知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明の課題は、アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬を提供することであり、例えば、脳虚血時におけるアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制することにより、脳保護を達成できる医薬を提供することにある。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、エブセレン及びその類縁化合物がアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制作用を有しており、脳虚血時において脳神経細胞の生存率を改善し、脳保護を達成できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0007】すなわち、本発明は、以下の一般式 (I) 又は (I') :

【化2】



(式中、R¹ 及び R² は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数1~6のアルキル基、又は炭素数1~6のアルコキシル基を示し、R¹ 及び R² が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく；R³ はアリール基、芳香族複素環基、5~7員のシクロアルキル基、又は5~7員のシクロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロア

ルキル基、及び該シクロアルケニル基は1個又は2個以上の置換基を有していてもよく；R⁴ は水素原子、水酸基、-S-グルタチオン基、-S-α-アミノ酸基、又はアリール部分に1個又は2個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し；R⁵ は水素原子又は炭素数1~6のアルキル基を示し、R⁴ 及び R⁵ は一緒になって単結合を形成してもよく；Y は酸素原子又は硫黄原子を示し；n は0~5の整数を示し；セレン原子は酸化されていてもよい) で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬を提供するものである。

【0008】上記発明の好ましい態様によれば、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレンアゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記のアポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬が提供される。上記の抑制薬は、例えば、脳虚血時においてアポトーシスに起因する脳細胞死、好ましくは脳神経細胞死を抑制することができる。

【0009】別の観点からは、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む脳保護剤が提供され、その好ましい態様として、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレンアゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記の脳保護剤が提供される。上記の脳保護剤は、脳梗塞などの脳虚血時におけるアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制し、脳細胞を保護して生存細胞数を増やすとともに、遠隔部位領域における二次的な変性を阻止して神経機能後遺障害を軽減する作用を有している。

【0010】さらに別の観点からは、上記の脳細胞死の抑制剤又は脳保護剤の製造のための、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の使用；アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制方法であって、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；及び脳虚血時における脳細胞の保護方法であって、上記物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

【0011】【発明の実施の形態】R¹ 及び R² が示す炭素数1~6のアルキル基は直鎖又は分枝鎖のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブ

チル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを用いることができる。R¹及びR²が示す炭素数1~6個のアルコキシル基は直鎖又は分枝鎖のいずれでもよく、例えば、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペントキシ基、n-ヘキソキシ基などを用いることができる。

【0012】R³が示すアリール基としては、例えば、炭素数6~14個、好ましくは炭素数6~10個の単環性ないし3環性、好ましくは単環性又は2環性のアリール基を用いることができる。具体的には、フェニル基又はナフチル基などが好適である。R³が示す芳香族複素環基としては、窒素原子、酸素原子、イオウ原子などのヘテロ原子を1個又は2個以上含む、例えば、単環性ないし3環性、好ましくは単環性又は2環性の芳香族複素環基を用いることができる。2個以上のヘテロ原子を含む場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、チエニル基、フリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリル基、ピリジリル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、インドリジニル基、イソインドリル基、インドリル基、イソキノリル基、キノリル基、フタラジニル基、ナフチリジニル基、キノキサリニル基、キナゾリニル基、シンノリニル基、プテリジニル基、カルバゾリル基、アクリジニル基、フェナンスリジニル基、フェノチアジニル基などを挙げる事ができる。

【0013】R³が示すアリール基、芳香族複素環基、5~7員環のシクロアルキル基、又は5~7員環のシクロアルケニル基は、その環上に1個又は2個以上の置換基を有していてもよい。2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基の存在位置は特に限定されず、環上の任意の位置に存在することができる。置換基の種類も特に限定されないが、例えば、C₁-C₆アルキル基、C₂-C₆アルケニル基、C₂-C₆アルキニル基、C₆-C₁₄アリール基、複素環基（本明細書において複素環という場合には、芳香族複素環のほか、部分飽和又は飽和の複素環を包含する）、ハロゲン原子（本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、ヒドロキシ基、オキソ基、アミノ基、アンモニウム基、イミノ基、メルカプト基、チオキソ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、リン酸基、スルホ基、ヒドラジノ基、C₁-C₆ウレイド基、C₁-C₆イミド基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、C₁-C₆アルコキシ基、C₁-C₆アルキルチオ基、C₆-C₁₄アリールオキシ基、複素環オキシ基、C₆-C₁₄アリールチオ基、複素環チオ基、C₇-C₁₅アラルキル基、複素環アルキル基、C₇-C₁₅アラルキルオキシ基、複素環アルキルオキシ基、C₁-C₆アルコキシカルボニル基、C₆-C₁₄アリールオキシカルボニル基、複素環オキシカルボニル基、C₂-C₇アルキル

カルボニル基、C₆-C₁₄アリールカルボニル基、複素環カルボニル基、C₂-C₇アルキルカルボニルオキシ基、C₆-C₁₄アリールカルボニルオキシ基、複素環カルボニルオキシ基、C₂-C₆アルキルカルボニルアミノ基、C₁-C₆スルホニル基、C₁-C₆スルフィニル基、C₁-C₆スルホニルアミノ基、C₁-C₆カルバモイル基、又はC₂-C₆スルファモイル基などを挙げる事ができる。

【0014】さらに、上記に例示した置換基は、さらに1又は2個以上の他の置換基で置換されていてもよい。このような例として、例えば、ヒドロキシC₁-C₆アルキル基、ハロゲン化C₁-C₆アルキル基、モノ若しくはジC₁-C₆アルキルアミノ基、ハロゲン化C₁-C₆アルキルカルボニル基、ハロゲン化C₆-C₁₄アリール基、ヒドロキシC₆-C₁₄アリール基、モノ又はジC₁-C₆アルキルカルバモイル基などを挙げる事ができる。もっとも、上記に説明した置換基は例示のためのものであり、これらに限定されることはない。

【0015】R⁴が示す-S-α-アミノ酸基の種類は特に限定されないが、チオール基含有のアミノ酸の残基であることが好ましく、-S-α-アミノ酸基は蛋白質又はペプチド化合物を構成するアミノ酸の残基であってもよい。蛋白質又はペプチド化合物としては、生理的に許容されるものであればその種類は限定されないが、例えば、アルブミン、グロブリン等の血清中の蛋白質を用いることが好ましい。血清中の蛋白質のうちアルブミンがより好ましく、ヒトアルブミンが特に好ましい。R⁴が示すアラルキル基のアリール部分は1個又は2個以上の置換基を有していてもよい。R⁴が示すアラルキル基としては、ベンジル基、パラヒドロキシベンジル基、2,4-ジヒドロベンジル基などを挙げる事ができる。R⁴及びR⁵は一緒になって単結合を形成してもよく、その場合には、R⁵が結合する窒素原子とセレン原子とを含む5員環が形成される。R⁵が示す炭素数1~6のアルキル基としては、上記に例示したものをを用いることができる。

【0016】本発明の医薬は、アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制薬又は脳保護剤として用いることができる。本発明の医薬の有効成分としては、上記式(1)又は式(1')で表される化合物のほか、それらの生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩は当業者に適宜選択可能である。また、遊離形態の化合物又は生理学的に許容される塩の水和物又は溶媒和物を有効成分として用いることもできる。なお、上記式(1)又は(1')で表される化合物は1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、光学異性体、ジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを本発明の医薬の有効成分として用いてもよい。

【0017】本発明の医薬の有効成分として、例えば、2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンアゾール-3(2H)-オン（一般名「エブセレン(ebselen)」）又はS-(2-フェニ

ルカルバモイルフェニルセレンル)-アルブミンなどを挙げることで、これらの化合物の生理学的に許容される塩又は水和物も有効成分として好ましい。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オンの製造方法は、特公平2-38591号公報に開示されており、5-(2-フェニルカルバモイルフェニルセレンル)-アルブミンの製造方法は特開平7-233056号公報に開示されている。従って、これらの製造方法を参照することにより、当業者は上記式(1)又は式(1')に包含される任意の化合物を容易に製造することが可能である。

【0018】上記式(1)又は式(1')で表される化合物は、アポトーシスに起因する脳細胞死を抑制する作用を有している。特に、脳虚血時において脳神経細胞の壊死に遅れて発生するアポトーシスに起因する脳細胞死、特に脳神経細胞死を顕著に抑制することができる。従って、脳梗塞などの脳虚血を発症した患者に本発明の医薬を投与することにより、虚血部位及びその周辺部、好ましくは虚血壊死周辺部においてアポトーシスに起因する脳細胞死を抑制することができる。その結果、脳虚血後において生存細胞数を増やし、遠隔部位領域における二次的な変性を阻止して神経機能後遺障害を軽減して、脳保護を達成することができる。さらに、急性期脳血管障害後に発症する脳血管性痴呆を抑制することができる。

【0019】本発明の医薬としては、上記式(1)又は式(1')で表される化合物及び生理学的に許容されるその塩、並びにそれらの水和物からなる群から選ばれる物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記物質の1種又は2種以上と製剤用添加物を含む医薬組成物を製造して投与することが望ましい。製剤用添加物としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、溶解剤等を用いることができ、2種以上の製剤用添加物を組み合わせて用いることもできる。医薬組成物の形態は特に限定されないが、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与用組成物、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などの非経口投与用組成物を挙げるができる。これらのうち、急性期に迅速な薬効発現を期待する場合には、静脈内投与用の注射剤又は点滴剤が好ましい。これらの医薬組成物は当業界で汎用の方法により製造することが可能である。

【0020】上記医薬の投与量は、適用すべき疾患の種類、患者の年齢や体重、疾患の重篤度などの条件に応じて、適宜選択することが可能である。例えば、経口投与の場合 成人一日あたり0.05～5,000mg(有効成分量として)の範囲である。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オンを有効成分として含む医薬を用いる場合には、その投与量は、経口投与の場合、成人一日あたり100～2,000mg(有効成分量として)であり、好ましくは、200～1,000mgの範囲である。もっとも、上記

の投与量は上記の条件に応じて適宜増減することができ。なお、本発明の医薬は、虚血発作などアポトーシスの引き金となる障害が発生した直後から数時間(例えば2～3時間)以内の急性期に投与することが望ましいが、その後にも投与を継続して差し支えない。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により説明するが、本発明は下記の実施例に限定されることはない。以下の実施例中、本発明の医薬として2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オン(エブセレン)を用いた。

【0022】<材料と方法>

(1)一過性中大脳動脈閉塞モデル

マウス(ICR 雄、25-30g)に2%ハロセンで麻酔を導入し、1%で麻酔を維持した。腹臥位で頭皮正中切開を行い、左側に剥離し、左側頭筋を下方に剥離した後、Laser Doppler Flowmeter (LDF)のアプローブ(fiber glass)を頭蓋骨にBregmaより外側6 mm、尾側1 mmの点に瞬間接着剤を用いて固定した。マウスを仰臥位にして頸部正中皮膚切開を行い、左側の総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を鈍的に露出して、総頸動脈、内頸動脈をミニクリップを用いて閉塞し、5-0絹糸を用いて外頸動脈を遠位部で結紮して切断した。脳血流量(CBF)が安定していることをLDFで確認した後(10分間)、歯科印象材料(シリコンレジン)でコーティングした8-0ナイロン糸(11 mm)を外頸動脈断端より挿入して内頸動脈へ進め、内頸動脈のミニクリップを除去し、さらにナイロン糸を頭蓋内へ進めて中大脳動脈を閉塞した。

【0023】30分間ナイロン糸を留置することで虚血負荷を与え、抜去して外頸動脈断端を電気凝固により閉塞し、総頸動脈のミニクリップを除去することで再灌流を得た。中大脳動脈の閉塞と再灌流はLDFにより確認した。再灌流後、CBFが虚血負荷前値に回復していることをLDFにより確認した(10分間)。LDF アプローブを除去し、頭部および頸部皮膚創を5-0絹糸で縫合し、麻酔を終了した。麻酔中は直腸温及び頭頸筋温をモニターし、サーモスタット制御heating padを用いて直腸温を37±0.5℃に維持した。マウスが麻酔から覚醒した後、32℃に設定した保温器内で虚血後3時間にわたり全身状態、神経所見を観察し、直腸温を測定した。虚血より72時間後に、ネブタール麻酔下に胸部正中切開、開胸を行い、経心的に4%パラホルムアルデヒド(0.1M PBS)で灌流固定して脳を摘出し、20%サッカロース(0.1M PBS)に浸潤して4℃で保存した。

【0024】(2)エブセレン投与

虚血30分前、12時間後の2回、エブセレン(10又は30 mg/kg)を経食道的に投与した。コントロール群として溶剤(0.5%カルボキシメチルセルロース、5 ml/kg)投与群を用い、各群7匹で試験を行った。

【0025】(3)組織学的検索

freezing microtomeを用いて脳切片(50 μm)を作成し

た。frontal poleより10枚毎にスライドグラスに張り付け、ニッスル染色(0.1% Cresyl violet)を行った。光学顕微鏡を用いて神経細胞の形態を観察し、損傷を受けた領域の面積、健常神経細胞数密度を計測した。

【0026】(4) TUNEL染色

同様にfrontal poleより10枚毎にスライドグラスに張り付け、アポトーシス細胞の組織学的検出法であるTUNEL染色に供した。クロロホルムで脱脂及び脱タンパクを行った後、terminal deoxynucleotidyl transferaseを用いて、ビオチン化dUTPで二本鎖DNA断端を標識した。標識されたビオチン化dUTPを、アビジン、HRP、DAB反応(ABC反応)により可視化し、光学顕微鏡を用いてTUNEL陽性領域面積及びTUNEL陽性細胞密度を計測した。

【0027】(5) 統計学的処理

虚血前及び灌流固定前の体重、虚血中、再灌流後3時間、及び灌流固定前の直腸温、側頭筋温、虚血中及び再灌流後の%CBFなどの生理的パラメーターに加え、組織学的検索及びTUNEL染色により得られる損傷脳体積、TUNEL

陽性神経細胞密度などの平均値、標準偏差などの基本統計量を各群で算出し、分散分析を行った。

【0028】<結果>30分間のMCA閉塞は線条体に限局した細胞死を誘発しており、変性した細胞中にはアポトーシスの指標となるTUNEL染色に陽性で、かつアポトーシス様形態を示すものが多数認められた。本実験モデルにおいては線条体のみ脳梗塞巣が観察され、それ以外の皮質部分には通常病変は認められなかった。皮質部分に病変部位が観察された場合には、その原因は手術手技上の問題と考えられるため、評価対象としては不適切と判断して解析対象から除外した。NISSL染色による線条体虚血病変部の体積は、コントロール群が $5.16 \pm 1.19\%$ であるのに対して、10 mg/kg群で $3.77 \pm 0.58\%$ 、30 mg/kg群で $4.04 \pm 0.68\%$ であり、それぞれコントロールの73.1%、78.3%にまで減少していた。

【0029】

【表1】

試験群	NISSL 染色	% of control	P 値(vs cont)
コントロール	$5.16 \pm 1.19\%$	-	-
10 mg/kg	$3.77 \pm 0.58\%$	73.1%	0.0073*
30 mg/kg	$4.04 \pm 0.68\%$	78.3%	0.0255*

対側(非虚血側) 大脳半球体積に対する%表示

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

【0030】また、病変部分に対してTUNEL染色を行った結果、陽性細胞密度はコントロール群で 2254.5 ± 1220.2 cells/mm²であるのに対して、10 mg/kg群で 711.6 ± 765.6 cells/mm²、30 mg/kg群で 491.6 ± 809.0 cells/mm²であり、それぞれコントロールの31.6%、21.8%にまで減少していた(表2)。陽性細胞体積はコントロール群で $5.04 \pm 1.56\%$ であるのに対して10 mg/kg群で 3.02 ± 1.3

9%、30 mg/kg群で $2.25 \pm 2.78\%$ であり、それぞれコントロールの59.7%、44.6%にまで減少していた(表3)。用量の増大に伴ってTUNEL陽性細胞の体積及び密度とも減少しており、アポトーシスに起因する脳細胞死の抑制作用について用量相関性が示唆された。

【0031】

【表2】

試験群	TUNEL 染色 (cells/mm ²)	% of control	P 値(vs cont)
コントロール	2254.5 ± 1220.2	-	-
10 mg/kg	711.6 ± 765.6	31.6%	0.007*
30 mg/kg	491.6 ± 809.0	21.8%	0.003**

** : $p < 0.01$

【0032】

【表3】

試験群	TUNEL 体積	% of control	P 値(vs cont)
コントロール	$5.04 \pm 1.56\%$	-	-
10 mg/kg	$3.02 \pm 1.39\%$	59.9%	0.0755
30 mg/kg	$2.25 \pm 2.78\%$	44.6%	0.0180*

対側(非虚血側) 大脳半球体積に対する%表示

*: $p < 0.05$

【0033】

【発明の効果】本発明の脳細胞死の抑制薬は、例えば脳梗塞などの脳虚血時において脳神経細胞の壊死に遅れて発生するアポトーシスに起因する脳細胞死を顕著に抑制

することができ、脳神経細胞を保護して生存細胞数を増やすとともに、遠隔部位領域における二次的な変性を阻止して神経機能後遺障害を軽減して脳保護を達成することができる。

!(7) 000-344663 (P2000-344663A)

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC95 MA01 NA14
ZA15 ZB22
4C206 AA01 AA02 JA80 MA01 NA14
ZA15 ZB22